

# Białka z rodziny ABC: niezwykła maszyneria. Budowa oraz mechanizm transportu

Magdalena Smolik<sup>1</sup>, Marta Stojak<sup>2</sup>, Maria Walczak<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, Polska

<sup>2</sup> Jagiellońskie Centrum Rozwoju Leków (JCET), Uniwersytet Jagielloński, ul. Bobrzyńskiego 14, 30-348 Kraków, Polska

Farmacja Polska, ISSN 0014-8261 (print); ISSN 2544-8552 (on-line)

## The ABC proteins family: an amazing machinery. Structure and mechanism of transport

The proper functioning of all living organisms depends on the supply of essential nutrients from the outside and the removal of harmful toxic compounds from the cells by primary and secondary membrane transport. The ABC transporters constitute the largest family of the proteins identified to date. They are ubiquitous among all living organisms, both Eukaryotes and Prokaryotes. In the group of proteins which form so called human transportome, exist 49 ABC transporters. In addition to performing important physiological functions (e.g. detoxification of the organism, being an essential element of blood-brain barrier, maintenance of lipid homeostasis or participation in cellular immune response), they also play a significant role in the pathogenesis of numerous diseases, including cystic fibrosis, Tangier disease and cancer. Primarily, the ABC proteins are responsible for the active export of a wide variety of substrates (including, for example: organic and inorganic ions, proteins, amino acids, oligonucleotides, complex carbohydrates, heavy metals, steroids, bile salts, vitamins, antibiotics, anti-cancer drugs and their metabolites, as well as many important signaling molecules, e.g. cysteinyl leukotrienes and prostaglandins) outside the cell which is driven by the hydrolysis of ATP. The minimal functional unit for efficient transport consists of two nucleotide binding domains (NBDs) and two trans-membrane domains (TMDs). The highly conserved NBD domains form the ATP-dependent driving force for transport. Each NBDs consists of RecA-like and  $\alpha$ -helical subdomains which include the following conservative motifs: Walker A motif, Walker B motif, H switch region, A-, Q-, D- loops as well as consensus C sequence. In turn, more structurally diverse TMD domains determine the substrate specificity of ABC proteins and create the translocation pathway across the lipid bilayer. This publication presents various strategies for substance transport and the structural complexity of the ABC transporters.

**Keywords:** ABC transporters, structure, transport mechanism.

## Adres do korespondencji

Magdalena Smolik, Katedra i Zakład Toksykologii, Wydział Farmaceutyczny, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, ul. Medyczna 9, 30-688 Kraków, Polska, e-mail: magdalena.smolik@uj.edu.pl

## Źródła finansowania

Nie wskazano źródeł finansowania.

## Konflikt interesów:

Nie istnieje konflikt interesów.

Otrzymano: 2020.10.23

Zaakceptowano: 2020.11.12

Opublikowano on-line: 2020.12.04

## DOI

10.32383/farmopol/130819

## ORCID

Magdalena Smolik (ORCID id: 0000-0003-1619-0913)


Marta Stojak (ORCID id: 0000-0003-2291-4068)

Maria Walczak (ORCID id: 0000-0002-5670-9866)

## Copyright

© Polskie Towarzystwo Farmaceutyczne

To jest artykuł o otwartym dostępie,

na licencji CC BY NC 

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>

## Wstęp

Prawidłowe funkcjonowanie wszystkich organizmów żywych uzależnione jest od dostaw niezbędnych składników odżywczych z zewnątrz oraz usuwania z komórek związków niepożądanych (toksycznych), na drodze pierwotnego oraz wtórnego transportu przez błony. Nie powinno dziwić, że znaczną część proteomu stanowią białka biorące udział w aktywnym transporcie substancji przez błonę plazmatyczną komórki lub błony organelli komórkowych [1, 2]. Na niebagatelne znaczenie aktywności transportowej białek wskazuje wysoki poziom kosztów metabolicznych ponoszonych w ramach pompowania cząsteczek przez błony komórkowe; koszty te mogą pochłaniać od 10 do 60% zapotrzebowania na ATP u bakterii i ludzi [3].

Transportery ABC reprezentują największą zidentyfikowaną dotychczas rodzinę białek. Występują powszechnie u wszystkich organizmów żywych. Transportery ABC mogą być odpowiedzialne za import składników odżywczych i innych cząsteczek do komórek (u *Prokaryota*), lub eksport m.in. toksyn, leków i lipidów przez błony poza obszar komórki (u *Prokaryota* i *Eukaryota*). Transportery ABC wykazują szerokie spektrum substratowe. Wśród substratów dla transporterów ABC wymienić można zarówno substancje endogenne, jak i ksenobiotyki, m.in.: jony organiczne i nieorganiczne, peptydy i białka, aminokwasy, oligonukleotydy, nukleozydy, cukry proste oraz złożone polisacharydy, metale ciężkie, sterydy, sole żółciowe, witaminy, antybiotyki, leki przeciwnowotworowe i ich metabolity, wiele kluczowych cząsteczek sygnałowych (np. leukotrieny, cysteinylowe, prostaglandyny) [4, 5, 6].

W grupie białek tworzących ludzki system transportu, stwierdzono obecność 48 transporterów ABC (49, po zaliczeniu transportera ABCC13 do ogólnej puli; jest jednak нефunkcyjnym transporterem ABC ze względu na brak kluczowych elementów budowy, tj. motywów Walker A, Walker B oraz motywu konsensusowego C [6]). Transportery te zgrupowane zostały w 7 podrodzin (ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCE, ABCF oraz ABCG). Wiele z nich, oprócz pełnienia ważnych fizjologicznych funkcji, odgrywa znaczącą rolę w patogenezie chorób, m.in.: mukowiscydozy, choroby Tangera, adrenoleukodystrofii i chorób nowotworowych [2, 3, 6, 7]. Białka należące do rodziny ABC stanowią istotny element bariery typu krew-narząd (m.in. bariery krew-mózg, krew-łożysko), są odpowiedzialne za detoksykację organizmu, utrzymywanie stanu homeostazy lipidowej oraz prezentację antygenu – procesu istotnego w budowaniu komórkowej

odpowiedzi immunologicznej. Aktywność transporterów ABC została także powiązana ze zjawiskiem lekooporności. Również udowodnione jest ich znaczenie dla biologii komórek nowotworowych. Wśród transporterów ABC odnaleźć można również takie białka, które pełnią rolę kanałów jonowych bądź stanowią czynnik regulujący aktywność tych kanałów [5, 6]. Uwzględniając mechanizm działania, eksportujące białka ABC można podzielić na: typowe białka transportujące, gdzie translokacja substratu odbywa się poprzez zmianę konformacji, np. P-gp – glikoproteina P [1, 8, 9]; kanały jonowe, w których stan przewodzący jest osiągany przez zmianę konformacji, np. błonowy regulator przewodnictwa (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*, CFTR) [1, 2, 8–12]; receptory, w przypadku których związanie ligandu umożliwia transmisję związanych z nim informacji, przy czym ligand niekoniecznie transportowany jest poprzez błonę, np. receptor sulfonilomocznika 1 (ang. *sulfonilurea receptor 1*, SUR1) [8, 9, 13]; oraz regulatory funkcjonowania innych kanałów jonowych, np. aktywność kanału potasowego Kir6.2 zależy od hydrolizy ATP przez „transporter” SUR1 (ABCC8) oraz SUR2 (ABCC9), który sam w sobie nie posiada zdolności transportujących [1, 8, 9, 11, 12].

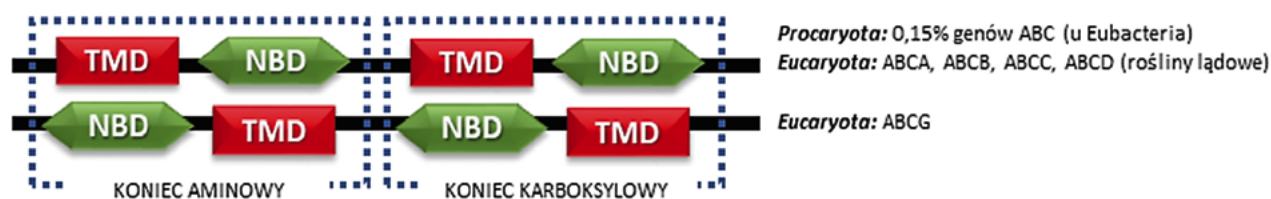
Minimalną jednostkę funkcjonalną niezbędną do trans-membranowego transportu substratu współtworzą dwie hydrofilowe domeny wiążące nukleotydy (NBD) i dwie domeny transbłonowe (TMD). Hydroliza ATP w obrębie NBD powoduje zmiany konformacyjne TMD, co skutkuje naprzemiennym dostępem zarówno do wnętrza, jak i środowiska zewnętrznego komórki, zapewniając jednokierunkowy transport substancji przez dwuwarstwę lipidową [2, 3, 14, 15].

Niniejsza publikacja umożliwi dokładniejsze zrozumienie mechanizmów transportu napędzanego hydrolizą ATP, wskaże złożoność strukturalną w rodzinie transporterów ABC oraz podkreśli wynikającą z nich wielopoziomowość funkcjonalną tych białek opisaną szerzej w poprzedniej pracy przeglądowej [6].

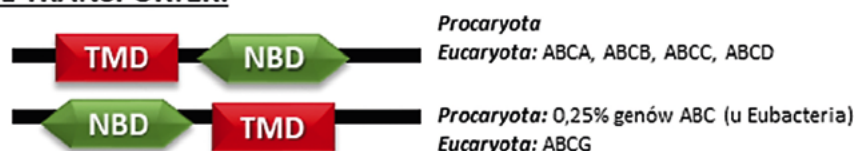
## Budowa transporterów ABC

W miarę postępujących badań nad składem sekwencji aminokwasów budujących transportery ABC zauważono, że pierwotna struktura domen wiążących ATP tych transporterów jest wysoce konserwatywna – chociażby poprzez obecność pętli wiążącej fosforany (pętla P, in. motyw Walker A) czy krótkiej sekwencji konsensusowej „LSGGQ”. Należy podkreślić, że transportery ABC są złożonymi systemami molekularnymi zarówno

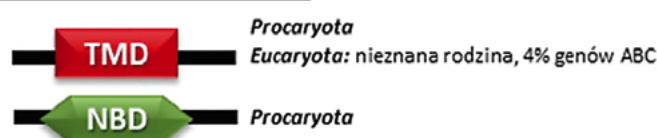
### PEŁNY TRANSPORTER:



### PÓŁ-TRANSPORTER:



### POJEDYNCZA STRUKTURA:



### STRUKTURA ABC2:



**Rycina 1.** Zróżnicowanie strukturalne transporterów ABC. Pełny transporter: gen transportera ABC koduje dwie domeny TMD i dwie domeny NBD; pół-transporter: gen transportera ABC koduje jedną domenę TMD i jedną domenę NBD; pojedyncza struktura: gen transportera ABC koduje pojedynczą domenę TMD lub NBD; struktura ABC2: gen transportera ABC koduje tylko dwie domeny NBD. Po prawej stronie wskazano występowanie określonych struktur u *Prokaryota* i/lub *Eucaryota* (wg [19], rycina zmodyfikowana).

**Figure 1.** Structural diversity of ABC transporters and their presence in *Prokaryotes* and/or *Eucaryotes*. Full-transporter: consists of two TMD domains and two NBD domains; Half-transporter: one TMD domain and one NBD domain; Single structure: a single TMD or NBD domain; ABC2 structure: only two NBD domains (according to [19], figure modified).

pod względem budowy, jak i funkcji. W kolejnych podrodzinalach scharakteryzowano najważniejsze elementy strukturalne transporterów ABC [2, 3, 9, 16–19].

Struktura transporterów ABC może wykazywać różny stopień złożoności, od najprostszych jednodomenowych transporterów u *Prokaryota*, po transportery składające się z kilku jednostek czynnościowych – u ssaków. W pełni funkcjonalny ludzki transporter ABC składa się z co najmniej dwóch domen wiążących nukleotyd (NBD) oraz dwóch domen trans-błonowych (TMD) połączonych kowalencyjnie – w tym przypadku mówimy o pełnych transporterach, (ang.: *full-transporter*, *full-size transporter*, np. ABCA1, ABCA7, ABCB1) – **rycina 1**. N-końcowe domeny trans-membranowe oraz C-końcowe domeny NBD połączone są w jeden polipeptydowy łańcuch współtworząc układ: TMD-NBD-TMD-NBD (lub

NBD-TMD-NBD-TMD). Wyjątek stanowią transportery należące do podrodziny ABCE oraz ABCF – nieposiadające domen TMD (tzw. struktura ABC2: NBD-NBD). Jeśli zaś białko składa się wyłącznie z 1 domeny NBD oraz 1 domeny TMD (TMD-NBD lub NBD-TMD), mamy do czynienia z tzw. pół-transporterem (ang. *half-transporter*; *half-size transporter*), którego aktywacja jest możliwa po utworzeniu homo- bądź heterodimeru z białkiem wykazującym ten sam schemat budowy. Przykładem takiego funkcjonalnego transportera, będącego heterodimerem dwóch pół-transporterów, jest transporter związany z prezentacją antygenu (ang. *transporter associated with antigen presentation*, TAP) powstały wskutek połączenia białka ABCB2 oraz ABCB3; natomiast aktywnym homodimerem jest np. ABCG1; z kolei ABCG2 może funkcjonować jako homodimer lub homomultimer, gdzie tworzeniu dimeru

**Tabela 1.** Konserwatywne motywy transportera ABC ( $\phi$  – reszta hydrofobowa,  $\beta$  – rozgałęziona reszta alifatyczna,  $\mu$  – reszta hydrofilowa, x – dowolny aminokwas, \* – motyw specyficzny dla transporterów ABC, \*\* – motyw spotykany także w innych (niż transportery ABC) białkach wiążących ATP, a – lokalizacja: subdomena RecA-podobna, b – lokalizacja: subdomena helikalna) [3, 7, 11, 14, 17, 27, 29, 38, 39].

**Table 1.** Conservative motifs of ABC transporter ( $\phi$  – hydrophobic residue,  $\beta$  – branched aliphatic residue,  $\mu$  – hydrophilic residue, x – any amino acid, \* – motif specific for ABC transporters, \*\* – motif also found in other (than ABC transporters) ATP-binding proteins, a – location: RecA-like subdomain, b – location: helical subdomain) [3, 7, 11, 14, 17, 27, 29, 38, 39].

NAZWA MOTYWU	SEKWENCJA AMINOKWASÓW	FUNKCJA
Pętla A <sub>a</sub> *	(F/K)xY	pozycjonowanie ATP poprzez interakcję z pierścieniem adeninowym
Walker A (Pętla P) <sub>a</sub> **	GxxxxGKT/S	formowanie kieszeni wiążących ATP, wiązanie reszt fosforanowych ATP lub ADP
Pętla Q <sub>a</sub> *	$\phi\phi$ /QQD/E	komunikacja między domenami NBD-TMD, sensor reszt $\gamma$ -fosforanowych ATP
Pętla X <sub>a</sub>	TxVG{E/D}{R/K}G	komunikacja między domenami NBD-TMD, wykrywanie peptydów
Motyw C <sub>b</sub> *	LSGGQ	formowanie kieszeni wiążących ATP, komunikacja między domenami NBD-TMD
Walker B <sub>a</sub> **	$\phi\phi\phi$ DE	formowanie kieszeni wiążących ATP, koordynuje wodę katalityczną i jony Mg <sup>2+</sup>
Pętla D <sub>a</sub>	SALD	komunikacja dimerów NBD-NBD, stabilizuje miejsce wiązania ATP
Pętla H <sub>a</sub> *	H (lub $\beta\phi\beta\mu$ H lub xxHxx)	region przełączający zależny od ATP, hydroliza ATP, diada katalityczna

towarzyszy wytworzenie mostków di-siarczkowych na poziomie cysteiny w pozycji 603 [1–3, 9, 10, 15, 23, 25].

### Domeny wiążące ATP (NBD)

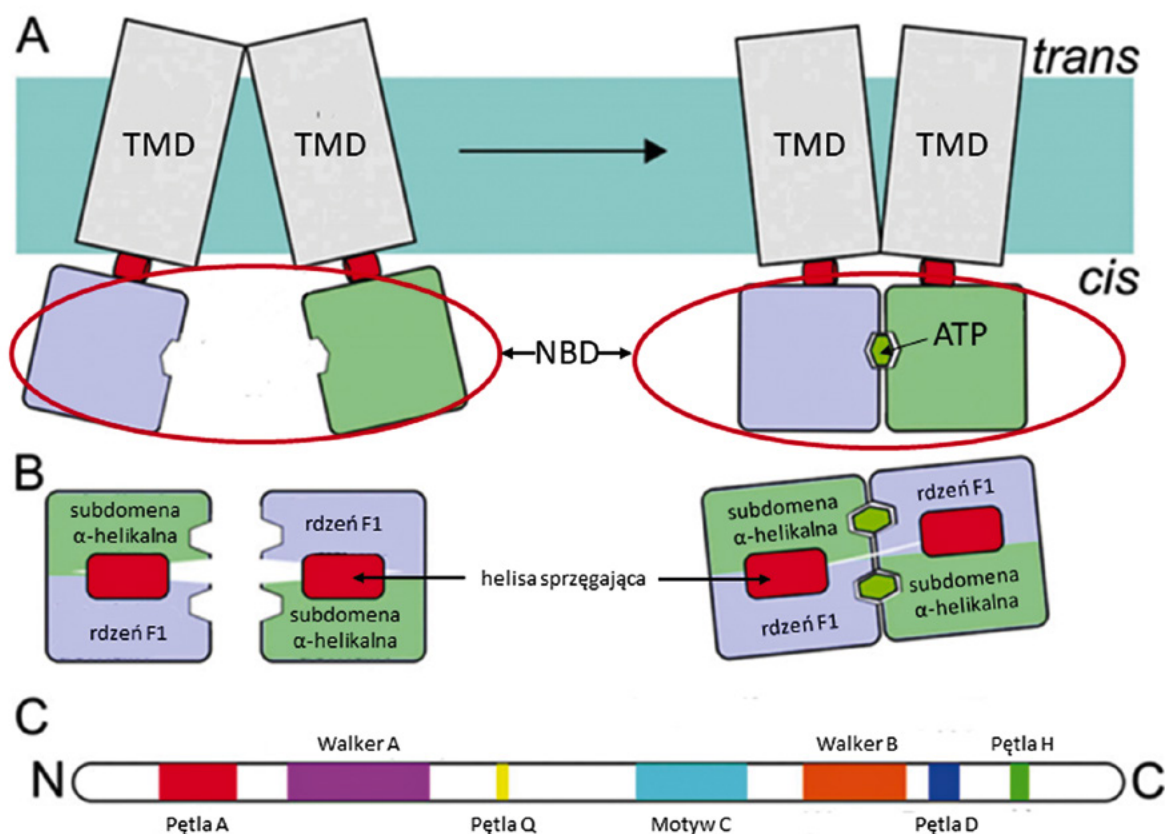
Domeny wiążące ATP (ang. *nucleotide binding domain*, NBD; *ATP-binding cassette*, ABC; *nucleotide binding folds*, NBF), zlokalizowane są na C-końcu białka i występują wyłącznie w cytoplazmie (bez ekspozycji zewnątrzkomórkowej, są jednak obwodowo związane z cytoplazmatyczną powierzchnią błony komórkowej). Wykazują charakter hydrofilowy [3, 8–10, 23–26].

Domeny NBD, ze względu na wysoce konserwatywny pod względem struktury i sekwencji charakter, są znakiem rozpoznawczym rodziny transporterów ABC. Domeny wiążące ATP stanowią podgrupę nadrodziny NTPaz zawierających pętlę P, a prowadzone przez nie procesy katalityczne są zależne od obecności jonów magnezu. Każda domena NBD posiada rdzeń składający się z sekwencji około 215 aminokwasów, specyficznej dla danego typu transportera ABC [7, 9]. W strukturze domen NBD, zarówno prokariotycznych, jak i eukariotycznych transporterów ABC, wyróżnić można dwie podstawowe składowe: charakterystyczną dla ATPaz zawierających pętlę P RecA-podobną subdomenę katalitycznego rdzenia (rdzeń F1), w obrębie której wyróżnić można 6 konserwatywnych elementów: motyw Walker A, motyw Walker B, pętlę A, Q, D i motyw H, współtworzących kieszeń wiążącą oraz hydrolizującą ATP; oraz bardziej zróżnicowaną strukturalnie, unikalną dla transporterów ABC subdomenę  $\alpha$ -helikalną, która zawiera sygnaturowy (in. konsensusowy) motyw C. Dzięki obecnym w obrębie domen NBD wysoce

konserwatywnym motywom (**tabela 1 i rycina 3**), możliwa jest identyfikacja podrodziny transporterów ABC [3, 19, 25, 27]. Ponadto, motywy te są niezbędne dla zachowania pełnej funkcjonalności transporterów poprzez wiązanie i hydrolizę ATP, jak również utrzymanie komunikacji na poziomie domen NBD-NBD oraz NBD-TMD [61]. Subdomena  $\alpha$ -helikalna w przypadku białka TAP obejmuje także pętlę X [17]. Wzajemna orientacja subdomen helikalnych i katalitycznych jest zależna od stanu nukleotydowego, tj. dostępności ATP [3, 7, 15, 16, 23, 28–30].

Faktem szczególnie istotnym, w kontekście transportu prowadzonego przez białka ABC, jest ATPazowa aktywność domen NBD – są zdolne do hydrolizy ATP, umożliwiając tym samym zmiany konformacyjne domen TMD, które to zmiany umożliwiają w konsekwencji translokację substratu. Miejsce wiązania nukleotydu jest umieszczone na styku domen NBD. Jak wspomniano we wstępie, najmniejszą funkcjonalną jednostkę prowadzącą efektywny transport substratu przez błonę komórkową, oprócz dwóch domen TMD, współtworzą dwie domeny wiążące nukleotydy (NBD1 i NBD2). Kompletna kieszeń wiążąca ATP (in. miejsce wiązania nukleotydów (ang. *nucleotide-binding site*, NBS)) złożona jest z koordynującej przyjęcie nukleotydu subdomeny rdzenia pierwszej domeny wiążącej nukleotydy (NBD1) oraz subdomeny helikalnej zlokalizowanej na NBD2 – **rycina 2** [1–3, 11, 15, 22, 23, 25, 31, 32]. Powstały dimer domen NBD zawiera dwa różne miejsca wiązania nukleotydów, z których każde jest zdolne do związania jednego nukleotydu. ATP działa poniekąd jak „molekularny klej” spajający dwie domeny NBD w konformacji *head-to-tail* (por. dalej) [29].





**Rycina 2.** Schematyczne przedstawienie struktury domen NBD.

- A. Widok z boku – ogólny schemat budowy transportera ABC. Domeny NBD łączą się z domenami TMD poprzez tak zwane helisy sprzęgające (zaznaczone na czerwono), stanowiące część domen TMD.
- B. Widok z góry: domeny NBD ze wskazaniem na wzajemny układ subdomen α-helikalnych oraz rdzeni F1; na czerwono zaznaczono helisy sprzęgające domeny NBD z TMD.
- C. Układ konserwatywnych motywów w obrębie domeny NBD (wg [7], rycina zmodyfikowana).

**Figure 2.** Structure of NBD domains.

- A. Side view: general representation of ABC transporter structure. The NBD domains link to the TMD domains through coupling helices (red) which are part of the TMD domains.
- B. Top view: NBD domains and the arrangement of α-helical subdomains and F1 cores within. The helices that couple NBD domains to TMD are marked in red.
- C. Arrangement of conserved motifs within the NBD domain (according to [7], figure modified).

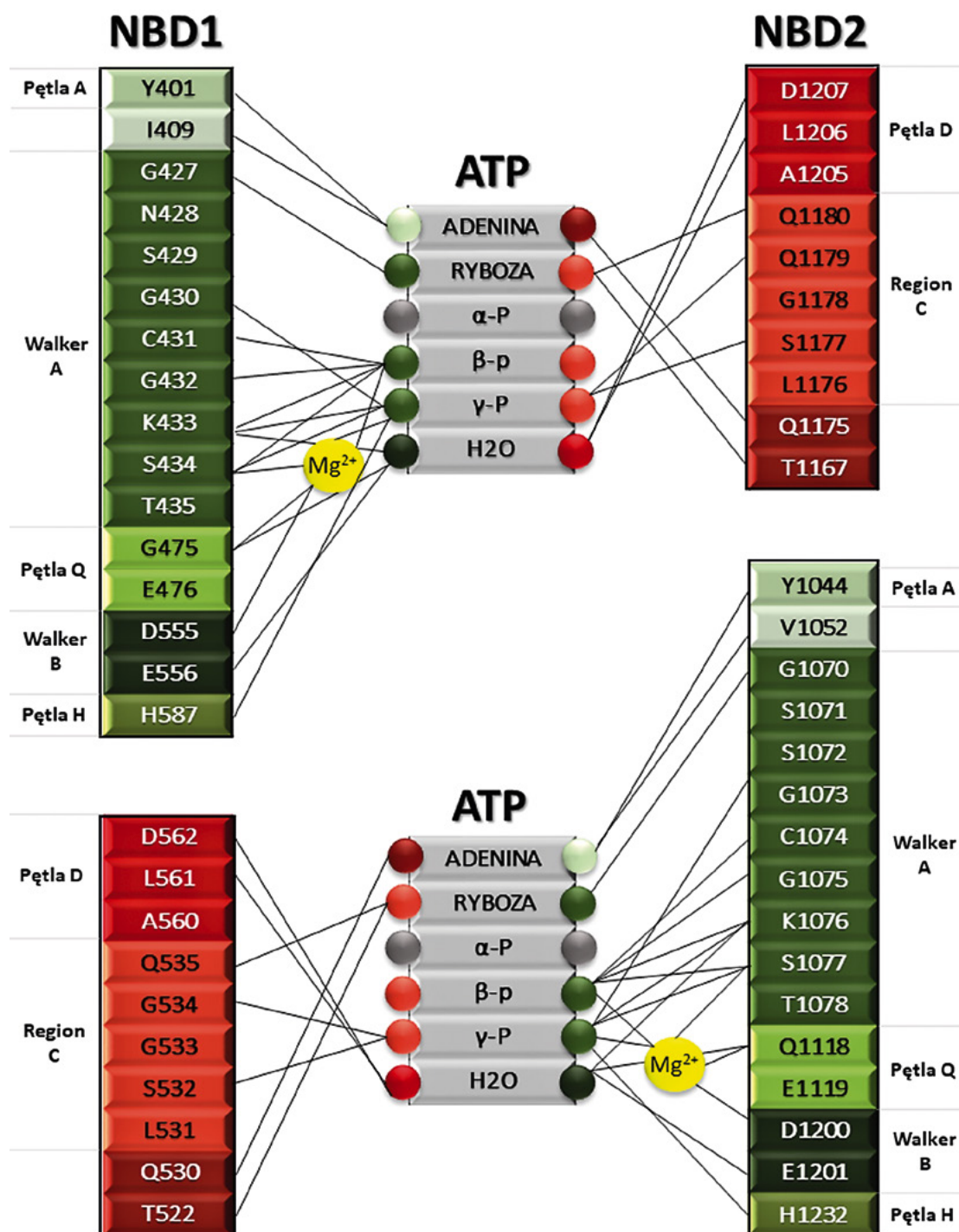
Domeny NBD eukariotycznych oraz prokariotycznych eksporterów ABC wykazują stosunkowo wysokie podobieństwo sekwencji aminokwasów (30–50%). Jedne z przeprowadzonych badań zrodziły ewolucyjną hipotezę, według której domena NBD wielu rodzin białek transportowych ABC pochodzi od wspólnego przodka *Eucaryota* i *Prokaryota* [19, 24].

#### Motywy Walker A oraz Walker B

Motyw Walker A (in: pętla P, ang. *P-loop*, *phosphate binding loop*) oraz Walker B są elementami charakterystycznymi dla wszystkich białek wiążących ATP (nie tylko transporterów ABC). Motywy te są ważnymi składowymi domen NBD, zlokalizowanymi w ich subdomenach

RecA-podobnych. Motywy Walker A i Walker B są od siebie oddzielone sekwencją około 90–120 aminokwasów, stanowiącą tzw. region centralny transportera oraz motyw C. Motywy te współtworzą kieszenie wiążące ATP [10, 11, 17, 21]. Motyw Walker A wraz z motywem C uczestniczą w wiązaniu nukleotydu, z kolei motyw Walker B i pętla H biorą udział w hydrolizie ATP [16]. W przypadku kilku białek ABC, mutacje konserwatywnej lizyny (motyw Walker A) lub asparagianu (motyw Walker B) w obu domenach NBD prowadzą do zablokowania zarówno hydrolizy ATP, jak i transportu substratu [33].

Motyw Walker A wykazuje stały schemat sekwencji – GXXXXGKT/S, gdzie: „X” oznacza dowolny aminokwas. Posiada bogatą



**Rycina 3.** Schemat przedstawiający reszty aminokwasowe konserwatywnych motywów subdomen NBD1 i NBD2 ludzkiego transportera P-gp oddziałujące z ATP. ATP zagnieżdża się pomiędzy motywami Walker A i Walker B oraz pętlami A, Q i H domeny NBD1 a regionem C i pętlą D domeny NBD2 (górna część schematu) i odwrotnie (poniżej) (wg [38], rycina zmodyfikowana).

**Figure 3.** Amino acid residues of the conserved motifs of NBD1 and NBD2 domains of the human P-gp transporter and their interaction with ATP. ATP nests between the Walker A and Walker B motifs and A, Q and H loops of the NBD1 domain and the region C and D loop of the NBD2 domain (upper part of the scheme) and *vice versa* (below) (according to [38], figure modified).

w glicynę pętlę P przyłączającą się do reszt α-, β-fosforanowych ADP oraz ATP [26, 28, 34]. Motyw Walker A, wiążąc ATP, owija się wokół jego łańcucha fosforanowego [7, 17, 28, 34, 35]. Pętla P zawiera w swojej strukturze wysoce konserwatywną resztę

lizyny. Atomy azotu reszt amidowych oraz grupa ε-aminowa lizyny tworzą sieć oddziaływań z β- i γ-fosforanowymi resztami ATP, przygotowując je na atak hydrolityczny [7, 23, 36]. Ponadto, spotykane w obrębie motywu Walker A reszty

cysteinowe są niezbędne dla uzyskania aktywności ATPazy [8]. Mutacje motywu Walker A mogą mieć wpływ (aczkolwiek odmienny, w zależności, której domeny NBD dotyczą: NBD1 czy NBD2) na funkcje transporterów należących do podrodziny ABCC. Mutacja w rejonie kodującym konserwatywną resztę Lys w NBD1 tylko częściowo inaktywuje białko, podczas gdy porównywalna mutacja w NBD2 zasadniczo eliminuje aktywność transportową, co jest efektem modyfikacji trzeciorzędowej struktury białka. Ponadto, analiza strukturalna NBD1 wykazała, że obecna w motywie Walker A Ser685 tworzy wiązanie wodorowe z Asp792 motywu Walker B i oddziałuje z jonami  $Mg^{2+}$  oraz resztami  $\beta$ -fosforanowymi związanego ATP. Zaobserwowano także, że interakcja między grupą hydroksylową reszty Ser685 a grupą karboksylową Asp792 odgrywa kluczową rolę w procesie fałdowania białka; z kolei interakcje grupy hydroksylowej Ser685 z magnezem i resztami  $\beta$ -fosforanowymi związanego ATP odgrywają ważną rolę w transporcie substancji zależnym od ATP [33, 35, 37]. W przypadku P-gp, inaktywacja obu domen NBD przez mutację konserwatywnych reszt aminokwasowych w motywie Walker A całkowicie znosi aktywność transportową zależną od ATP [14].

Z kolei w budowie motywu Walker B wyróżnia się zazwyczaj cztery reszty alifatyczne i następujące po nich dwie ujemnie naładowane reszty aminokwasowe – na ogół są to, odpowiednio, reszta asparagianu i kończąca motyw reszta glutaminianu. Schemat budowy tego motywu to:  $\phi\phi\phi\phi DE$  (gdzie:  $\phi$  oznacza dowolną hydrofobową resztę aminokwasową) [26, 28]. Występujący w sekwencji aminokwasowej motywu Walker B asparagian, koordynuje i stabilizuje jony magnezu, których obecność jest niezbędna dla prawidłowego przebiegu hydrolizy ATP [17, 35, 36]. Funkcje motywu Walker B nie są jednak w pełni poznane; oprócz sugerowanego udziału w stabilizacji jonów  $Mg^{2+}$ , wskazuje się także na jego udział w koordynowaniu aktywności tzw. wody katalitycznej, biorącej udział w hydrolizie ATP (szczególną rolę w przebiegu tej aktywności odgrywa najprawdopodobniej kończąca motyw Walker B reszta kwasu glutaminowego) [1, 2, 8, 10, 20, 22, 24–26, 31]. Opisano także, że obecność glutaminianu w większości NBD białek ABC ma krytyczne znaczenie dla rozszczepiania wiązania  $\beta$ - $\gamma$  fosfodiesterowego cząsteczki ATP. W przypadku transporterów z podrodziny ABCC, zaobserwowano pewne strukturalne różnice w obrębie motywów Walker B domen NBD1 i NBD2, przekładające się na funkcjonalność tych transporterów. Za proces rozszczepiania wiązania  $\beta$ - $\gamma$  fosfodiesterowego cząsteczki ATP w domenie NBD1 transportera ABCC1

(MRP1) odpowiedzialna jest reszta Asp; z kolei w NBD2 funkcję tę standardowo odgrywa glutaminian. Brak glutaminianu (w NBD1) okazuje się mieć znaczący wpływ na przebieg wiązania i hydrolizy ATP, a w konsekwencji na cały cykl katalityczny transportera ABCC1 [14, 33, 35].

### Motyw konsensusowy C

Motyw C (in. region C, peptyd łącznikowy, ang. *ABC signature motif/domain*, *C-loop*) jest fragmentem o sekwencji aminokwasowej: „LSGGQ”, znajdującym się tuż przed motywem Walker B, w obrębie subdomeny helikalnej. Jest elementem specyficznym wyłącznie dla rodziny białek ABC, nie występuje w pozostałych białkach wiążących ATP [1, 2, 10, 20–22, 24, 25, 34]. Jego rola nie została jeszcze jednoznacznie określona – postuluje się, że motyw ten jest zaangażowany w wiązanie ATP – współtworzy bowiem kieszeń wiążącą ATP. W pełnych transporterach, pętla P, motyw Walker B oraz motyw C obydwu domen NBD dzielą wspólną przestrzeń w miejscu ich styku – przyjmują, tzw. układ *head-to-tail*, tworząc tym samym 2 miejsca wiążące i hydrolizujące ATP. Sugeruje się również, że region C funkcjonuje jako sensor grup  $\gamma$ -fosforanowych i/lub sygnałów transdukowanych do domen TMD [15, 17, 23, 26–28].

### Pętla A

Pętla A odgrywa istotną rolę w procesie wiązania i hydrolizy ATP. Pętla A o wzorze sekwencji (F/K)xY (gdzie: x oznacza dowolny aminokwas) posiada poprzedzającą motyw Walker A wysoce konserwatywną resztę tyrozynową, umożliwiającą interakcje z adeniną obecną w związanym ATP. Bierze tym samym udział w pozycjonowaniu cząsteczki ATP w obrębie NBD. Analiza struktury domen NBD w formie związanej z nukleotydami wskazuje, że pomiędzy pętlą A i adeninowym pierścieniem ATP mogą występować oddziaływania  $\pi$ - $\pi$ , wiązania wodorowe lub oddziaływania van der Waalsa [1, 3, 7, 15, 17, 31, 35, 38].

### Pętla Q

Pętla Q jest fragmentem o sekwencji  $\phi\phi/QQD/E$ , gdzie  $\phi$  oznacza dowolną hydrofobową resztę aminokwasową [26]. Pętla Q umiejscowiona jest na styku subdomeny RecA-podobnej oraz subdomeny  $\alpha$ -helikalnej. Występująca na N-końcu pętli Q glutamina (stąd inna nazwa: pętla glutaminowa lub pętla Gln), za pośrednictwem cząsteczki wody (na zasadzie ataku nukleofilowego) oraz wytworzonych wiązań wodorowych, pozostaje w kontakcie z resztą  $\gamma$ -fosforanową ATP (związanego przez rdzeń F wewnątrz domeny) – jest zatem sensorem adenozynotrifosforanu [26, 28, 30, 35].



Ponadto, konserwatywna Gln obecna w pętli Q oddziałuje z katalitycznym  $Mg^{2+}$  i hydrolizuje cząsteczkę wody [35]. Dane strukturalne uzyskane dla rozpuszczalnych bakteryjnych domen NBD, skrzystalizowanych w obecności nukleotydów lub ich braku, sugerują, że wygięcie pętli Q pozwala na przemieszczanie się subdomeny helikalnej względem rdzenia F1, umożliwiając tym samym kontrolę allosterycznego sprzężenia między dwiema kieszeniami wiążącymi ATP. Wydaje się również, że lokalizacja pętli Q ma krytyczne znaczenie dla przebiegu sprzęgania procesu wiązania substratu do domeny TMD z wiązaniem ATP przez domenę NBD we wszystkich transporterach typu ABC [1, 3, 7, 15, 25, 26, 30, 31, 39].

W eksperymencie przeprowadzonym przez Zolneriks et al. [30] zbadano wpływ mutacji punktowej wprowadzonej w obszarze konserwatywnej glutaminy pętli Q obecnych w jednej lub obu domenach NBD. Uzyskane wyniki umożliwiły ocenę wpływu pętli Q na konformację oraz funkcjonowanie transportera ABCB1 (P-gp); w tym celu zastosowano odpowiednio przeciwciało wrażliwe na konformację (UIC2) oraz wyznakowany fluorescencyjnie substrat dla tego transportera – BODIPY-werapamil. W badaniach wykorzystano komórki linii HEK293T transfekowane plazmidami kodującymi ludzki transporter ABCB1 (komórki niezmutowane: transporter posiadający dwie pętle Q lub zmutowane: transporter z jedną lub dwiema niefunkcjonalnymi pętlami Q). Wykazano, że w przypadku podwójnej mutacji, transporter zostaje uwięziony w stanie otwartym do wnętrza komórki, który co prawda pozawala na związanie leku, ale nie dochodzi do sprzężenia z cyklem ATPazowym; substrat nie może być zatem usunięty do przestrzeni pozakomórkowej. Z kolei mutacja w obrębie pojedynczej pętli Q zapewniała zachowanie funkcjonalności w transporcie BODIPY-werapamilu na poziomie obserwowanym przy braku mutacji. W tym przypadku, najprawdopodobniej doszło do związania tylko jednej cząsteczki ATP zamiast dwóch. Całkowite lub częściowe zamknięcie szczeliny pomiędzy NBD1 a NBD2 (odpowiednio w mutantach typu dzikiego i mutantach z pojedynczą pętlą Q) powoduje dalszą zmianę konformacyjną, prowadzącą w konsekwencji do reorganizacji helis TMD, skutkującej zamknięciem bramki wejściowej (po cytozolowej stronie błony komórkowej) i otwarcia bramki wyjściowej w celu uwolnienia związanego substratu do środowiska pozakomórkowego. Przyпуска się, że hydroliza reszty  $\gamma$ -fosforanowej ATP uwalnia pętlę Q i rozłącza domeny NBD, pozwalając transporterowi na powrót do konformacji otwartej do wewnątrz (*inward-open conformation*). Pojawiły się także spekulacje sugerujące, że

jedynie ATP połączony wiązaniem wodorowym z domeną Q podlega hydrolizie, czym można tłumaczyć odnotowane zmniejszenie się o połowę ATPazowej aktywności komórek wykazujących funkcjonalność tylko jednej pętli Q, co jednak nie ograniczyło efektywnego wpływu werapamilu sprzężonego z BODIPY poza komórkę. Dokonane obserwacje stawiają pętlę Q w centrum dowodzenia całym mechanizmem molekularnym leżącym u podstaw aktywności transportowej białka ABCB1 – koordynuje cykl naprzemiennego dostępu domen TMD do wnętrza komórki (*inward-open conformation*) oraz do przestrzeni zewnątrzkomórkowej (*outward-open conformation*) z cyklem katalitycznym ATP zachodzącym w NBD. Stanowi molekularne wyjaśnienie dla allosterii miejsc katalizy ATP, ich oddziaływań z miejscami wiążącymi substraty w domenach TMD oraz wynikających z nich zmiennych stanów konformacyjnych TMD. Pętla Q odgrywa zatem istotną rolę w utrzymaniu cech funkcjonalnych transportera, pośrednicząc w interakcjach pomiędzy subdomenami NBD i domenami trans-membranowymi białek ABC [3, 28, 30, 39].

### Pętla D

Pętla D to fragment domeny NBD o sekwencji „SALD”, unikalny dla rodziny transporterów ABC. Stanowi łącznik (poprzez wiązania wodorowe) pomiędzy dwiema domenami NBD – bierze udział w dimeryzacji domen NBD. Pętla D pozycjonuje i polaryzuje wodę hydrolityczną, co związane jest z obecnością szkieletu karbonylowego. Aktywacja cząsteczek wody do rozpoczęcia hydrolizy ATP odbywa się dzięki współpracy pętli D z motywem Walker B. Obecny w sekwencji pętli D konserwatywny asparaginian kontaktuje się z cząsteczkami wody stabilizującej wiązanie nukleotydu. Po związaniu ATP, asparaginian sprzęga wiązaniami wodorowymi oraz oddziaływaniami elektrostatycznymi resztę  $\gamma$ -fosforanową ATP z pętlą H i motywem Walker A przeciwnej domeny NBD [1, 15, 17, 26, 31, 35].

Mutacja punktowa prowadząca do podstawienia konserwatywnego asparaginianu w pętli D jednej z domen NBD przez alaninę w transporterze TAP1 skutkuje inhibicją hydrolizy ATP, podczas gdy aktywność transportująca jest zachowana – sugeruje to, że transport, mimo że wciąż pozostaje nukleotydowo-zależny, niekoniecznie wymaga do tego celu energii pochodzącej z hydrolizy ATP. Z kolei podwójna mutacja skutkująca podstawieniem asparaginianu przez alaninę w obydwu domenach NBD całkowicie inaktywuje transport substratu. Pętla D bierze zatem udział w komunikacji NBD-TMD, zapewniając ściśle jednokierunkowy transport substratów w poprzek błony [26].



### Pętla H

Pętla H (ang. *switch region/motif; His-loop*) jest unikalnym dla rodziny transporterów ABC fragmentem domeny NBD o wzorze sekwencji  $\beta\phi\beta\mu H$ , gdzie  $\beta$  oznacza rozgałęzioną resztę alifatyczną,  $\mu$  jest resztą hydrofilową, zaś  $\phi$  oznacza dowolną hydrofobową resztę aminokwasową [17]. Bierze udział w transporcie protonów pomiędzy reagentami biorącymi udział w rozkładzie ATP. Pętla H uczestniczy w polaryzacji atakujących cząsteczek wody na potrzeby hydrolizy ATP. Obecna w sekwencji pętli H histydyna pozostaje w stałym kontakcie z przyłączonym ATP, oddziałując z labilnymi grupami  $\gamma$ -fosforanowymi (jest ich sensorem) [1, 3, 17, 18, 25, 26, 28, 35]. Badania wykazały, że mutacja prowadząca do podstawienia konserwatywnej histydyny przez alaninę, znacznie ogranicza ATPazową aktywność domen NBD [31].

### Pętla X

Pętla X jest obszarem subdomeny helikalnej NBD eksporterów ABC o sekwencji TxVG{E/D}{R/K}G (x oznacza dowolny aminokwas) znajdującym się w pobliżu motywu C. Pętla X jest zlokalizowana blisko miejsc wiążących ATP oraz w pewnym zakresie pozostaje w kontakcie ze sprzęgającymi się helisami domen TMD – głównie z jego pierwszą pętlą wewnątrzkomórkową (ICL1, ang. *first intracellular loop*). Odłączając się od nich, bierze udział w konformacyjnej reorganizacji łączących się domen TMD, niezbędnych dla transportu substratu. Badania wykazały, że pętla X jest regionem domeny NBD, na który hydroliza ATP oddziałuje najsilniej – stanowi ważny element w komunikacji domen NBD-TMD. Uczestniczy w transmisji sygnału o wiązaniu i hydrolizie ATP. Pętla ta jest także sensorem peptydów, co ma szczególne znaczenie w przypadku transportera TAP, gdzie kluczową rolę w sprzęganiu wiązania peptydu (antygeny) z jego translokacją odgrywa glutaminian wchodzący w skład sekwencji pętli X [16, 17, 26, 34]. Po podstawieniu konserwatywnego glutaminianu (Glu-602) w sekwencji pętli X transportera TAP1/2, okazało się, że wiązanie peptydów (substratów) nie uległo zmianie; zmniejszyła się natomiast aktywność i wydajność transportu – do 20% w przypadku mutantów E602D. Z kolei mutacja E602R całkowicie wyłączała zdolności transportowe białka TAP. Sugeruje to znaczącą rolę w transmisji zmian konformacyjnych dyktowanych hydrolizą ATP i translokacją substratu. Należy podkreślić, że glutaminian jest konserwatywnym elementem sekwencji pętli X tylko w przypadku podrodzin ABCB oraz ABCC. Konieczne jest jednak prowadzenie dalszych badań w celu wyjaśnienia roli poszczególnych

aminokwasów obecnych w sekwencji pętli X dla transmisji sygnałów pomiędzy domenami NBD i TMD oraz zrozumienia, jaki sposób ewentualne mutacje odciskają swoje piętno na procesach wiązania i hydrolizy ATP [34].

### Domena trans-membranowa (TMD)

Domena trans-membranowa, (ang. *trans-membrane domain*, TMD; *membrane-spanning domain*, MSD) znajduje się na N-końcu białka ABC. Wyjątkowo w przypadku transporterów ABCG orientacja jest odwrotna: domena NBD obecna jest na N-końcu, zaś domena TMD na C-końcu białka [10, 24]. Domena TMD składa się z przynajmniej 6 (max. 10, zależnie od transportera) hydrofobowych trans-membranowych  $\alpha$ -helis (ang. *membrane-spanning  $\alpha$ -helices*, MSH) z funkcją rozpoznania oraz translokacji substratu (na w pełni funkcjonalny transporter przypada minimum 12 (max. 20) takich  $\alpha$ -helis) [1, 5, 8, 9, 11, 12, 15, 18, 23, 26]. Pomimo że domeny TMD w obrębie poszczególnych rodzin transporterów ABC wykazują tę samą ogólną architekturę, mogą różnić się zarówno liczbą helis przechodzących przez błonę komórkową, jak i sekwencją budujących helisę aminokwasów [27]. W porównaniu z domenami NBD, budowa domen TMD jest mniej konserwatywna – stanowi jednak odzwierciedlenie chemicznej różnorodności translokowanych substratów. Wysokie podobieństwo strukturalne domen trans-membranowych – TMD1 oraz TMD2 najprawdopodobniej jest efektem duplikacji genów wywodzących się od homodimerycznego przodka [2, 3, 15, 20, 21, 31]. Ilość transbłonowych  $\alpha$ -helis może determinować aktywność transportera [9]. Ciekawy wyjątek stanowią białka ABCE oraz ABCF, w strukturze których nie stwierdza się obecności domeny transbłonowej – posiadają jedynie domenę wiążącą ATP zarówno na N-, jak i C-końcowym odcinku białka; jest to tzw. struktura typu ABC2 (**rycina 1**). W związku z tym mało prawdopodobne jest, że białka te pełnią rolę transporterów. Są natomiast ewolucyjnie z sobą spokrewnione – co potwierdzone zostało na podstawie analizy podobieństwa struktury domen NBD. Wykazują wyłącznie cytoplazmatyczną ekspresję. Najprawdopodobniej biorą udział w regulacji syntezy białek i/lub ich ekspresji (np. inhibicja aktywności rybonukleaz) [19, 20, 22, 24, 25].

Domeny TMD są miejscem wiązania substratu oraz tworzą ścieżkę dla przechodzących przez błonę cząsteczek, określając tym samym specyficzność transporterów poprzez miejsce wiążące substrat. Ciekawym przykładem jest transporter P-gp, w przypadku którego stwierdzono kilka miejsc wiązania substratu – stąd też tzw.

kieszon wiążącą substrat w obrębie TMD określono mianem „polispecyficznej”. Wśród substratów P-gp znajdują się m.in.: chemioterapeutyki, inhibitory proteaz HIV, leki immunosupresyjne, leki przeciwartymiczne, blokery kanałów wapniowych, leki przeciwbólowe, antybiotyki, leki przeciwhistaminowe, barwniki fluorescencyjne, pestycydy – łącznie około 200 substancji. Helisy domen TMD tworzą trans-membranowy szlak z możliwością dostępu zarówno od strony cytozolowej (*inward facing*), jak i po zewnętrznej stronie komórki (*outward facing*) [1–3, 9, 11, 12, 15, 21, 22, 25]. Warto zaznaczyć, że eksportery ABC posiadają dodatkowo długie pętle wewnątrzkomórkowe (ang. *intracellular loop*, ICL), które wydłużają helisy TM o ok. 25 Å poza powierzchnię membrany w kierunku cytoplazmy [3, 15, 23]. Takie rozwiązanie strukturalne zapewnia lepszy kontakt domen TMD z domenami NBD [15]. Z kolei białka ABCB1, ABCB2, ABCB8/9 zawierają dodatkowo N-końcowe przedłużenie składające się z pięciu helikalnych fragmentów transbłonowych – tzw. N-terminalna domena transbłonowa (ang. *extra N-terminal transmembrane domain*, TMD<sub>0</sub>), połączona z rdzeniem cząsteczki poprzez pętlę L<sub>0</sub> – także istotny element w kontekście regulacji aktywności białek transportujących z rodziny ABC. Okazuje się, że domena TMD<sub>0</sub> jest niezbędna dla przebiegu transportu subkomórkowego czy interakcji z innymi białkami. W przypadku białka SUR1 udokumentowano wpływ TMD<sub>0</sub> na aktywność transportera, który wiąże się z kanałem potasowym Kir6.2 poprzez tę domenę. Cztery domeny TMD<sub>0</sub> obecne są także w strukturze białka TAP; każda z nich jest przyłączona do rdzenia transportera – w tym przypadku jednak domeny te nie są czynnikami niezbędnymi dla przebiegu aktywności transportowej. Fragment TMD<sub>0</sub> obecny w strukturze białka ABCB9 nie jest istotny w kontekście jego funkcji transportowych, lecz odgrywa ważną rolę w ukierunkowaniu działania tego transportera na błonę lizosomów [15, 20, 26]. Wyróżnia się także niezdefiniowaną jeszcze dokładnie grupę białek ABC o strukturze pojedynczej domeny – posiadają wyłącznie jedną domenę TMD bądź jedną domenę NBD (dotyczy głównie *Prokaryota*) [19].

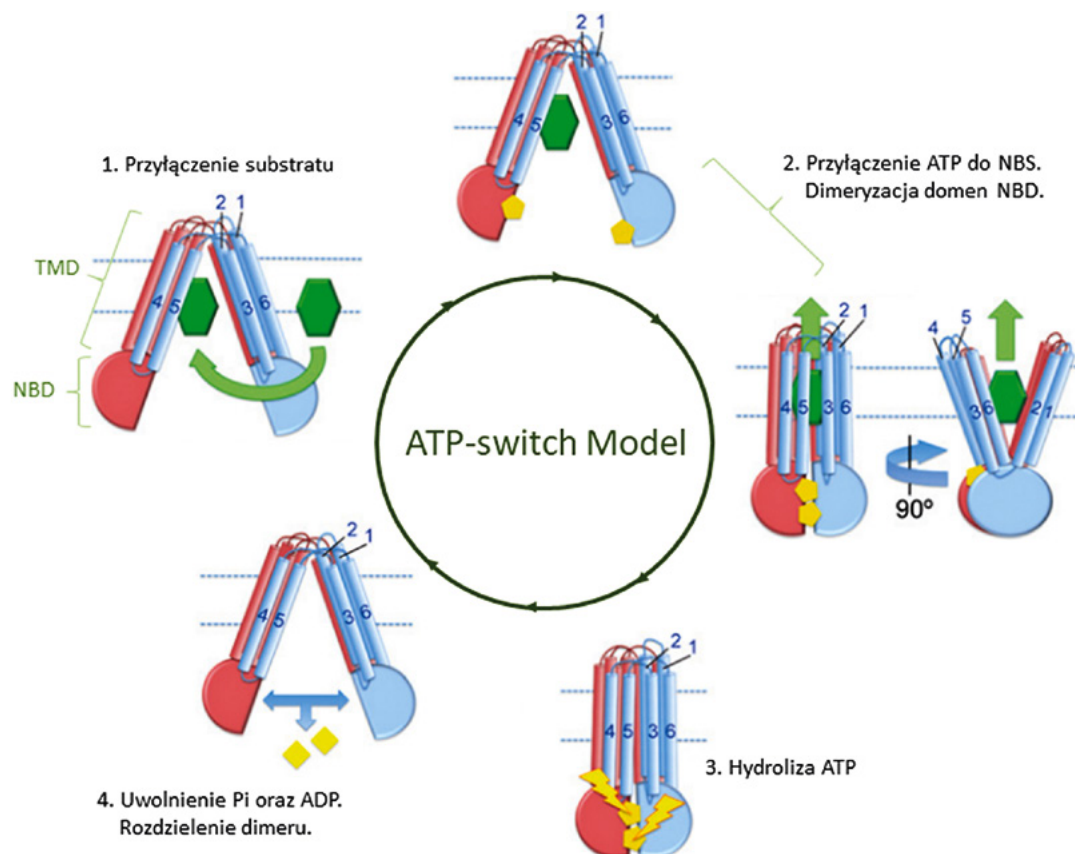
W trakcie cyklu: translokacja substratu-hydroliza ATP domeny TMD przechodzą zmiany konformacyjne, pozwalające na związanie substratu po jednej stronie błony komórkowej i uwolnienie go po drugiej. Zmiany konformacyjne domen TMD są indukowane przez reorganizację domen NBD pobudzającą cykl transportowy poprzez związanie ATP i jego hydrolizę [29]. Proces ten został szerzej opisany w następnym rozdziale.

## Mechanizm transportu

Transportery ABC spotykane u *Eucaryota* umożliwiają wyrzut cząsteczek poza obszar komórki. Proces ten wymaga jednak nakładu energii. Dlatego też transportery ABC wykształciły zdolność wiązania ATP i jego hydrolizy do ADP i Pi, co generuje energię niezbędną do translokacji cząsteczek w poprzek błony komórkowej [8, 10, 20–22, 31, 32, 40]. W związku z tym transportery ABC zostały określone mianem *traffic ATPases* [8]. Warto zaznaczyć, że, jak podają niektóre źródła, do transportu substratów wystarczające jest już samo związanie cząsteczki lub cząsteczek ATP, niekoniecznie jego hydroliza [18]. Miejsca o aktywności ATPazy determinuje obecność wspomnianych wcześniej motywów specyficznych dla całej rodziny białek ABC. Każda z dwóch domen NBD najpierw wiąże ATP poprzez interakcję z motywem Walker A (oddziałuje z grupami α- oraz β-fosforanowymi ATP oraz koordynuje jodem Mg<sup>2+</sup> zasocjowanym z ATP), motywem Walker B (pozycjonuje i polaryzuje hydrolityczne cząsteczki wody) oraz pętlą H (oddziałuje z labilnymi grupami γ-fosforanowymi ATP). Dopiero w takich warunkach druga domena NBD może wejść w interakcję z miejscem wiążącym ATP i uzupełnić miejsce aktywne poprzez dostarczenie pętli D (stabilizuje cząsteczki wody) oraz motywu C (sensor grupy γ-fosforanowej pośredniczący w ATP-zależnej dimeryzacji domen NBD). Taka postać zamkniętego dimeru domen NBD zapewnia odpowiednie warunki do zajścia hydrolizy ATP [2, 3, 9, 11, 12, 15, 31].

Kluczowymi procesami w działaniu transporterów ABC są: etap katalityczny ATP w obrębie domeny NBD oraz, będący jego następstwem, etap transportu substratu z udziałem domeny TMD [1]. Kwestia mechanizmu warunkującego transport substancji przez białka ABC nie jest jednak do końca wyjaśniona. W związku z tym zaproponowano kilka modeli transportu, których zadaniem jest odpowiedzenie na pytania: w jaki sposób i w jakim stopniu translokacja substancji jest powiązana z hydrolizą ATP? Jaka tak naprawdę jest kolejność poszczególnych etapów w cyklu transportowym? Jak poszczególne etapy wpływają na zmianę konformacji transportera? W jaki sposób sygnały o zmianie konformacji są przekazywane do fizycznych lokalizacji kolejnych zdarzeń cyklu transportowego? [18].

Jednym z lepiej opisanych mechanizmów transportu substancji przez białka ABC jest ten zgodny z modelem „ATP-switch”. Sygnałem do rozpoczęcia transportu może być np. obciążenie komórki cholesterolem, jak ma to miejsce w przypadku transportera ABCA1. Związanie substratu



**Rycina 4.** Cykl transportowy białka ABC wg modelu ATP-switch (wg [15], rycina zmodyfikowana).

**Figure 4.** ATP-switch model of the ABC protein transport cycle (according to [15], figure modified).

przez wewnątrzkomórkową część domeny TMD promuje przełączanie dimeru domen NBD ze stanu otwartego w zamknięty, zwiększając jego powinowactwo do ATP. Właśnie to przejście stanowi siłę napędową dla translokacji substratu do przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Model ten sugeruje także, że to właśnie przyłączenie ATP, nie zaś jego hydroliza, generuje odpowiednią zmianę konformacyjną domen TMD konieczną do uwolnienia substratu po zewnętrznej stronie błony komórkowej. Natomiast rolą hydrolizy ATP jest przywrócenie otwartego układu dimeru domen NBD oraz wprowadzenie transportera w stan spoczynku (**rycina 4**). Model ten podkreśla współpracę obydwu części transportera, tj. domen NBD oraz TM, w tworzeniu miejsc hydrolizy ATP oraz drogi translokacji substratu [1–3, 9, 11, 15, 18, 23, 25, 32]. Zgodnie z modelem „alternating access”, transportery oscylują pomiędzy stanem otwartym i zamkniętym oraz, w konsekwencji, pomiędzy stanem o wysokim i niskim powinowactwie do ligandu po różnych stronach membrany [1, 3, 9, 15, 31]. Z kolei van Veen et al. zaproponowali tzw. model „silnika dwucylindrowego” (ang. *two-cylinder engine mechanism*), zgodnie z którym każdy transporter posiada dwa miejsca wiązania, jedno o wysokim

powinowactwie wewnątrzkomórkowym oraz drugie o niskim powinowactwie zewnątrzkomórkowym [1, 11, 18].

Stosunkowo dobrze scharakteryzowano mechanizm transportu w przypadku białka P-gp, gdzie może on zachodzić m.in. według następujących schematów: translokacji substratów zgodnej z modelem odkurzacza hydrofobowego (ang. *vacuum cleaner model*) lub modelem flipazy (ang. *flippase model*) [8]. Wg zaproponowanego przez Raviv et al. modelu „vacuum cleaner”, cząsteczki lipofilne skoncentrowane w przestrzeni śródbłonowej, niebędące jednak integralną częścią błony komórkowej, są rozpoznawane i wciągane przez P-gp do wnętrza przestrzeni transportującej; następnie są usuwane poza komórkę. Nie zachodzi tu potrzeba aktywacji miejsc wiązania o wysokim powinowactwie. Z kolei autorzy hipotezy flipazowej – Higgins i Gottesman – ustalili, że P-gp działa jako eksporter leków aktywnie translokując je wbrew gradientowi stężeń z przestrzeni wewnątrzkomórkowej do wewnętrznej, a następnie do zewnętrznej warstwy błony komórkowej i poza komórkę [2, 8, 21, 31, 32]. Możliwość takiego sposobu transportu dotyczy wyłącznie cząstek amfipatycznych (np. fosfatydylocholiny) [32].

Wciąż nie jest jasne, ile miejsc wiążących substrat występuje w obrębie domeny TMD – najprawdopodobniej obecne są dwa takie miejsca. Informacja o przyłączeniu substratu indukującym zmianę konformacyjną w obrębie TMD jest przekazywana do domeny NBD – jest to sygnałem do rozpoczęcia hydrolizy ATP [1–3, 9, 11, 12, 25, 31]. Standardowo przyjęło się, że do przeprowadzenia procesu hydrolizy ATP zdolne są obydwie domeny NBD. W przypadku białka P-gp w danym momencie aktywacji tylko jedna domena NBD przechodzi w stan katalityczny – regulacja katalityczna odbywa się naprzemiennie: raz przez jedną, innym razem przez drugą domenę NBD [2, 8, 15, 21]. Innym przykładem jest białko CFTR – tu jedno z miejsc wiążących ATP w obrębie NBD wykazuje mutację uniemożliwiającą prowadzenie hydrolizy ATP. Ponadto zaobserwowano, że domena NBD1 białka CFTR pośredniczy w otwarciu kanału, zaś NBD2 w jego zamknięciu [15, 23]. Funkcjonalną asymetrię domen NBD stwierdzono także w przypadku białka MRP1. Domena NBD1 posiada wyższe powinowactwo do wiązania ATP, lecz wykazuje bardzo niską aktywność ATPazy – tzw. miejsce zdegenerowane. Z kolei domena NBD2 jest zdolna do przeprowadzenia hydrolizy ATP – tzw. miejsce konsensusu. Podobny schemat działania stwierdzono w przypadku transportera SUR1 oraz TAP [2, 8, 21].

Problematyczną kwestię wciąż stanowi liczba cząsteczek ATP przypadających na pojedynczy cykl transportu danego substratu. Źródła podają, że najprawdopodobniej są to 1–2 cząsteczki ATP [1, 3, 11, 15, 23, 25, 31]. Według jednej z hipotez ilość hydrolizowanych cząsteczek ATP jest wprost proporcjonalna do ilości energii wymaganej do destabilizacji zamkniętego dimeru domen NBD–NBD [15, 29, 40].

## Podsumowanie

Transportery ABC są obecnie uznawane za jedno z najważniejszych ze wszystkich rodzin białek. Nie można lekceważyć ich znaczenia tak dla fizjologii komórki, jak i szeroko pojętego rozwoju medycyny. Wiedza na temat transporterów błonowych ABC wciąż nie jest jednak kompletna – wiele pytań rodzi chociażby kwestie dotyczące sposobu rozpoznawania oraz wiązania substratów. Konieczne jest prowadzenie dalszych badań, które mogą okazać się niezbędne dla pełnego zrozumienia zarówno molekularnych, jak i kinetycznych mechanizmów funkcjonowania transporterów ABC. Uzyskane spostrzeżenia dostarczą cennych informacji, które będą mogły zostać wykorzystane w rozwoju nowych leków.

## Piśmiennictwo

- Linton KJ. Structure and function of ABC transporters. *Physiology* (Bethesda). 2007; 22: 122–130. doi: 10.1152/physiol.00046.2006.
- Wilkins S. Structure and mechanism of ABC transporters. *F1000Prime Reports*. 2015; 7: 1–9. doi: 10.12703/P7-14.
- Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009; 10: 218–227. doi: 10.1038/nrm2646.
- Karvar S. The role of ABC transporters in anticancer drug transport. *Turk J Biol*. 2014; 38: 800–805. doi: 10.3906/biy-1407-3.
- Slot AJ, Molinski SV, Cole SP. Mammalian multidrug-resistance proteins (MRPs). *Essays Biochem*. 2011; 50: 179–207. doi: 10.1042/bse0500179.
- Smolik M, Suraj J, Kurpińska A, Walczak M. Transportery błonowe ABC i ich wielofunkcyjny charakter/ABC membrane transporters and their multifunctional nature. *Postępy Hig Med Dosw*. 2018; 72: 606–622. doi: 10.5604/01.3001.0012.1966.
- ter Beek J, Guskov A, Slotboom DJ. Structural diversity of ABC transporters. *J Gen Physiol*. 2014; 143: 419–435. doi: 10.1085/jgp.201411164.
- Efferth T. The human ATP-binding cassette transporter genes: from the bench to the bedside. *Curr Mol Med*. 2001; 1: 45–65. doi: 10.2174/1566524013364194.
- Higgins ChF, Linton K. ABC transporters: an introduction and overview. W: *ABC Proteins: From Bacteria to Man*, red.: IB Holland, SPC Cole, K Kuchler, Ch F Higgins. Academic Press, 2003, xvii–xxiii.
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res*. 2001; 11: 1156–1166. doi: 10.1101/gr.184901.
- Higgins CF. ABC transporters: physiology, structure and mechanism—an overview. *Res Microbiol*. 2001; 152: 205–210. doi: 10.1016/s0923-2508(01)01193-7.
- Locher KP. Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters. *Nat Struct Mol Biol*. 2016; 23: 487–493. doi: 10.1038/nsmb.3216.
- Proks P, Shimomura K, Craig TJ, et al. Mechanism of action of a sulphonylurea receptor SUR1 mutation (F132L) that causes DEND syndrome. *Hum Mol Genet*. 2007; 16: 2011–2019. doi: 10.1093/hmg/ddm149.
- Payen LF, Gao M, Westlake CJ, et al. Role of carboxylate residues adjacent to the conserved core Walker B motifs in the catalytic cycle of multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *J Biol Chem*. 2003; 278: 38537–38547. doi: 10.1074/jbc.M305786200.
- Zolnerciks JK, Andress EJ, Nicolaou M, Linton KJ. Structure of ABC transporters. *Essays Biochem*. 2011; 50: 43–61. doi: 10.1042/bse0500043.
- Damas JM, Oliveira AS, Baptista AM, Soares CM. Structural consequences of ATP hydrolysis on the ABC transporter NBD dimer: molecular dynamics studies of HlyB. *Protein Sci*. 2011; 20: 1220–1230. doi: 10.1002/pro.650.
- Lawson J, O'Mara ML, Kerr ID. Structure-based interpretation of the mutagenesis database for the nucleotide binding domains of P-glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778: 376–391. doi: 10.1016/j.bbame.2007.10.021.
- Li W, Zhang H, Assaraf YG, et al. Overcoming ABC transporter-mediated multidrug resistance: Molecular mechanisms and novel therapeutic drug strategies. *Drug Resist Updat*. 2016; 27: 14–29. doi: 10.1016/j.drug.2016.05.001.
- Xiong J, Feng J, Yuan D, et al. Tracing the structural evolution of eukaryotic ATP binding cassette transporter superfamily. *Sci Rep*. 2015; 5: 16724. doi: 10.1038/srep16724.
- Chen Z, Shi T, Zhang L, et al. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett*. 2016; 370: 153–164. doi: 10.1016/j.canlet.2015.10.010.
- Cole SP. Multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1), a “multitasking” ATP-binding cassette (ABC) transporter. *J Biol Chem*. 2014; 289: 30880–30888. doi: 10.1074/jbc.R114.609248.
- Li G, Gu HM, Zhang DW. ATP-binding cassette transporters and cholesterol translocation. *IUBMB Life*. 2013; 1–8. doi: 10.1002/iub.01165.
- Locher KP. Review. Structure and mechanism of ATP-binding cassette transporters. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009; 364: 239–245. doi: 10.1098/rstb.2008.0125.
- Moitra K, Dean M. Evolution of ABC transporters by gene duplication and their role in human disease. *Biol Chem*. 2011; 392: 29–37. doi: 10.1515/BC.2011.006.



25. Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics*. 2009; 3: 281–290. doi: 10.1186/1479-7364-3-3-281.
26. Eggensperger S, Tampé R. The transporter associated with antigen processing: a key player in adaptive immunity. *Biol Chem*. 2015; 396: 1059–1072. doi: 10.1515/hsz-2014-0320.
27. Higgins CF, Linton KJ. The ATP switch model for ABC transporters. *Nat Struct Mol Biol*. 2004; 11: 918–926. doi: 10.1038/nsmb836.
28. Gaudet R, Wiley DC. Structure of the ABC ATPase domain of human TAP1, the transporter associated with antigen processing. *EMBO J*. 2001; 20: 4964–4972. doi: 10.1093/emboj/20.17.4964.
29. Szöllösi D, Rose-Sperling D, Hellmich UA, Stockner T. Comparison of mechanistic transport cycle models of ABC exporters. *Biochim Biophys Acta Biomembr*. 2018; 1860: 818–832. doi: 10.1016/j.bbmem.2017.10.028.
30. Zolnercijs JK, Akkaya BG, Snippe M, Chiba P, Seelig A, Linton KJ. The Q loops of the human multidrug resistance transporter ABCB1 are necessary to couple drug binding to the ATP catalytic cycle. *FASEB J*. 2014; 28: 4335–4346. doi: 10.1096/fj.13-245639.
31. Paolini A, Baldassarre A, Del Gaudio I, Masotti A. Structural Features of the ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter ABCA3. *Int J Mol Sci*. 2015; 16: 19631–19644. doi: 10.3390/ijms160819631.
32. Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev*. 2003; 55: 3–29. doi: 10.1016/s0169-409x(02)00169-2.
33. Frelet A, Klein M. Insight in eukaryotic ABC transporter function by mutation analysis. *FEBS Lett*. 2006; 580: 1064–1084. doi: 10.1016/j.febslet.2006.01.024.
34. Kluth M, Stindt J, Dröge C, et al. A mutation within the extended X loop abolished substrate-induced ATPase activity of the human liver ATP-binding cassette (ABC) transporter MDR3. *J Biol Chem*. 2015; 290: 4896–4907. doi: 10.1074/jbc.M114.588566.
35. Boumendjel A, Boutonnat J, First JR. ABC Transporters and Multidrug Resistance. John Wiley & Sons, Inc, Hoboken, New Jersey, 2009.
36. delToro D, Ortiz D, Ordyan M, et al. Walker-A Motif Acts to Coordinate ATP Hydrolysis with Motor Output in Viral DNA Packaging. *J Mol Biol*. 2016; 428: 2709–2729. doi: 10.1016/j.jmb.2016.04.029.
37. Buyse F, Hou YX, Vigano C, et al. Replacement of the positively charged Walker A lysine residue with a hydrophobic leucine residue and conformational alterations caused by this mutation in MRP1 impair ATP binding and hydrolysis. *Biochem J*. 2006; 397: 121–130. doi: 10.1042/BJ20051363.
38. Ambudkar SV, Kim IW, Xia D, Sauna ZE. The A-loop, a novel conserved aromatic acid subdomain upstream of the Walker A motif in ABC transporters, is critical for ATP binding. *FEBS Lett*. 2006; 580: 1049–1055. doi: 10.1016/j.febslet.2005.12.051.
39. Dassa E. Natural history of ABC systems: not only transporters. *Essays Biochem*. 2011; 50: 19–42. doi: 10.1042/bse0500019.
40. Smith PC, Karpowich N, Millen L, et al. ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer. *Mol Cell*. 2002; 10: 139–149. doi: 10.1016/s1097-2765(02)00576-2.